

■原 著■ 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

相模川河口域天然藻類群集の群集構造の推定への 次世代シーケンサーの試験的適用

鈴木祥弘^{1,3} 渡辺瑛士朗¹ 金沢謙一¹ 西本右子²

Trial Application of Next-Generation DNA Sequencer for the Estimation
of Structures of Natural Algal Communities
in the Estuary of the Sagami River

Yoshihiro Suzuki^{1,3}, Eishiro Watanabe¹, Ken'ichi Kanazawa¹
and Yuko Nishimoto²

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: suzuki03@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: In the winter of 2017, algal communities in the Sagami Bay were analyzed. In the mouth of the estuary of the Sagami River, algal communities different from those in offshore-water bodies were found. The structures of the 2 different communities in the mouth and offshore water-bodies were also analyzed by Amplicon analysis with NGS. DNA samples required for the analysis were obtained by extraction and purification from cells collected by the filtration of seawater. Although a sufficient number of OTU could be determined, they showed completely different phylogenetic relationships from the results of microscopic observations. The index region of *psbA* in this study was not suitable for DNA barcoding.

Keywords: amplicon analysis, community structure, diatoms, DNA barcoding, nextgeneration sequencing

序論

自然環境中で生物は周囲の環境の影響を受けながら生活している。生物の集まりである個体群は環境に対応して消長を繰り返している。環境への対応は生物種ごとに異なり、生態系を構成する種数や各種個体群の個体数（個体群密度）、すなわち生物群集の構造は生態系ごとに大きく異なる。生物群集の構造を明らかにすることは、生態系の環境とそこに生活する生物の関係を考える上で重要である¹⁾。我々は相模川河口域生態系の長期変動を検討するため、棲息環境と対応付けて植物プランクトン群集構造の解析を行ってきた²⁻⁴⁾。群集構造の解析に必要な植物プランクトン各種の同定と計数は、光学顕微鏡を用いた形態観察によって行う。しかし、形態観察による藻類種の同定には熟練が必要であり、十分な形態観察を実施しても、種同定が難しい種も少なくない。労力を必要とする形態観察による同定と計数は、群集

構造の解析を質的にも量的に制限してきた。

近年、形態観察に加えて各種の持つ DNA 塩基配列を指標として、藻類種の同定が行われるようになった。生物種や生態型で差異が認められる適切な DNA 領域について塩基配列を決定して比較することで、形態観察によることなく種同定が可能である⁵⁾。塩基配列をバーコードに見立てた DNA バーコード計画では、分類群ごとに適切な DNA 領域を指定し、効率的に塩基配列情報を蓄積することを目指している。生物種と塩基配列を対応付けた情報がデータベースとして十分に蓄積されれば、対象とする個体の塩基配列をデータベースに照合することで、個体の種同定が可能になる⁶⁾。さらに、百万分子を超える DNA 塩基配列を決定（シーケンシング）する次世代シーケンシング技術（NGS）をこの種同定に適用することが可能である。NGS を生物群集に適用するメタ

ゲノム解析と DNA バーコードを用いれば、一度の解析で生物群集全体の種同定が可能になる。非常に多数の塩基配列を一度に確認する方法では、顕微鏡観察では見つけにくい出現頻度の低い種の検出も可能になると考えられる。試料に含まれていた DNA 量に比例してアンプリコン (PCR で増幅された DNA 断片) が増幅されると仮定できれば、NGS で決定された配列の割合から、生物群集に含まれていた種ごとの DNA 量、さらに生物量が推定できる。DNA バーコードとメタゲノム解析を活用することで、群集構造の解析を質的・量的に改善できる可能性が高い⁶⁾。

本研究では、相模川河口域生態系の植物プランクトン群集にメタゲノム解析を適用した。DNA バーコード領域として、全ての光合成生物が持つ *psbA* (光化学系 II 反応中心 D1 蛋白質コード遺伝子) を用い、植物プランクトンの群集構造の解析がメタゲノム解析により可能であるかどうかを検討した。

材料と方法

環境要因と植物プランクトン生物量の測定

2017 年 12 月に相模川河口から沖合に向かって南北方向に 5.0 km の範囲で観測を行った。調査船舷側より、直読式総合水質計 (AAQ126, JFE アドバンテック株式会社) を垂下して、観測海域の各地点で電気伝導度、温度、圧力に加えて、クロロフィル蛍光強度を測定した。電気伝導度と圧力は、測定器付属のソフトウェアにより塩濃度 (‰) と水深 (m) に換算した。海水密度の指標 (σ) は、塩濃度と温度、圧力から算出した海水密度 (kg m^{-3}) より 1000 を引いて求めた。全地球測位システム (GPS) 端末 (FG-530, EMPEX 社) を用いて、測定期間中の時刻と緯度・経度を記録し、測定時刻から観測地点を算出した。観測点の河口からの距離を求め、各測定値の鉛直分布を入力し、海洋断面上の各要因の分布をコンターマップとして図表化した (Gsharp, dlp 社)。

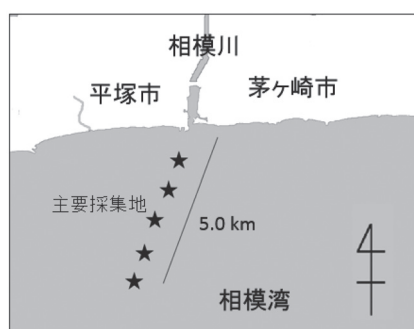


図1. 観測海域と観測地点. 図中の 5,000m の直線に沿って観測を行った。

植物プランクトン群集構造

バンドーン採水器 (離合社) を用い、表層と水深 20m の海水 10 l を採水した。海水試料は沈降係数板 (Combined Plate Chamber, Hydro-Bios, Germany) を用いて濃縮し、光学顕微鏡 (IX70, オリンパス) で種同定と細胞密度測定を行った。

全 DNA の調整

採水した試料をプラスチックボトルに移し、暗所で保冷しながら実験室に輸送した。試料 50ml を減圧濾過し、フィルター (Isopore GTTP02500, ミリポア) 上に集められたプランクトンを冷凍庫内で凍結し (-80°C) 保存した。抽出の操作を行うため冷凍庫より取り出したフィルター上の試料は、室温で融解後直ぐに、抽出緩衝液で洗い落とし、マイクロチューブ中でペッセルを用いて破碎した。破碎液から DNA 吸着カラム法 (DNeasy, Qiagen) で全 DNA を抽出した。精製された全 DNA の濃度と共雑物の過多は、試料の吸収スペクトルで検討した。全精製試料 200 μl のうち各 2.0 μl を鋳型とし、光合成生物 *psbA* 領域に対するプライマー (F: TNCAYTTCTAYCCNVTHTTGGGA, R: RNCATGTGGAATGGGTGCAT) を用いて PCR を行った。95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分、その後、94 $^{\circ}\text{C}$ \times 20 秒、55 $^{\circ}\text{C}$ \times 30 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ \times 2 分の一連の反応を 35 回繰り返し、最後に 72 $^{\circ}\text{C}$ \times 7 分で伸長反応を終了、その後 4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。得られた PCR 産物をアンプリコン読解に供した。

NGS によるアンプリコン読解

DNA 溶液の濃度測定を行い (Synergy H1 (Bio Tek), QuantiFluor dsDNA System (Promega))、アンプリコンの濃度を調整した。得られたアンプリコンに対し 2step tailed PCR 法でライブラリーを作製した。作製したライブラリーは断片長、副生成物の有無など品質確認を行った。次世代シーケンサー (NextSeq, Illumina) を用いて 2x300 bp の条件でシーケンシングを実施した。

読解データの解析

マージ後の断片長 290 塩基、リードの断片長 230 塩基、最低オーバーラップ長 10 塩基とし、クオリティフィルタリングを通った配列をマージした。解析ソフト (Usearch drive5) で OTU (operational taxonomic unit) を求めた。得られた代表配列を BLAST 検索し、最も類似性の高い生物種を推定した。また、出現頻度の高い 15 の OUT について、解析ソフトを用いて (CLC Sequence Viewer, QIAGEN

Bioinformatics) を用いて系統関係を解析した。

結果と討論

海況

観測実施日 (2017.12.18) の塩濃度は河口付近の表層でわずかに低く 33.2‰であったが、河口の水深 3.0 m 以深やその他の地点では 34.2‰であった (図 2a)。16.5℃の最低水温も河口付近で認められた。沖合 1000m の地点でも、16.7℃以下のやや低い温度が表層で認められたが、沖合 2000m 地点では表層で 16.8℃、5m 以深で 17.0℃となり、さらに沖合では 17.0℃で表層から水深 45m まで一定となった (図 2b)。河口付近でのわずかに低い塩濃度と水温は、相模川からの淡水流入の影響であると考えられる。しかしながら、その影響は限定的で、影響を受けやすい表層でも沖合 2500m 以近に限られていた。密度の指標 σ は調査海域全体でほぼ均一であり、塩分成層を示す低密度の水塊は表層 1m 足らず、沖合 2000m 足らずに限定されていることが明らかであった (図 2c)。これ以外の部分の密度は 25.0-25.1 でほぼ一定

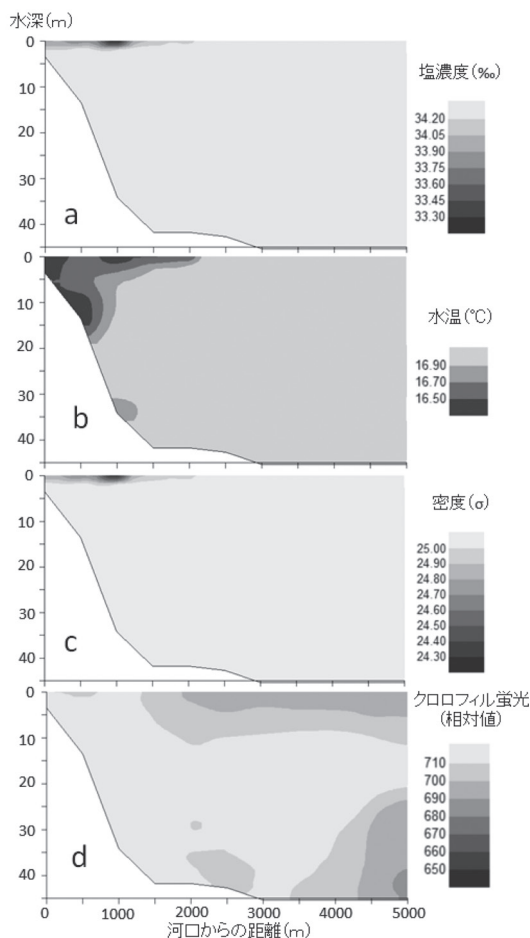


図 2. 観測海域の海況とクロロフィル a 蛍光シグナル。河口から沖合 5000m までの塩濃度 (a)、水温 (b)、密度 (c)、クロロフィル a 蛍光シグナル (d) を表す。

であった。この結果は、少なくとも水深 45m までの範囲で表層水の冷却に伴う鉛直混合が盛んに生じていることを示していた。この時期の深い鉛直混合は植物プランクトンの増殖を低く抑えていたと考えられる。また、相模川からの淡水の流入がわずかであることも植物プランクトンの増殖を低く抑えていたと考えられる。クロロフィル蛍光シグナルは沿岸域で 720 相対値とわずかに高かったが、測定海域全体ではほぼ一定の値を示した (図 2d)。

植物プランクトン群集の種組成

海況に違いが認められた河口と沖合 5000m 地点で水深 1m 層と水深 10m 層から試料を採取した。海水試料中の藻類を 40-400 倍の倍率で顕微鏡観察したところ、主として珪藻類から成る植物プランクトン群集が観察された。藻類の細胞密度は河口の 1m 層と 10m 層の試料でそれぞれ 11800 と 9300 細胞 ℓ^{-1} 、沖合の 1m 層と 10m 層の試料でそれぞれ 5500 と 5300 細胞 ℓ^{-1} であった (図 3)。クロロフィル蛍光強度の差は 5% 足らずであるにも関わらず (図 2d)、細胞密度に大きな差が生じたことは、種組成の違いと対応していた。相模川からの淡水流入の影響を受ける河口では羽状目珪藻の *Navicula* spp. が優勢し 1m 層と 10m 層でそれぞれ 68.4% と 29.6% を占めていた。さらに、河口では羽状目の様々な珪藻類が 1m 層と 10m 層でそれぞれ 11.7% と 16.2% を占め、*Navicula* spp. と合わせて、羽状目珪藻類が卓越する生物群集を形成していた。これに対して沖合

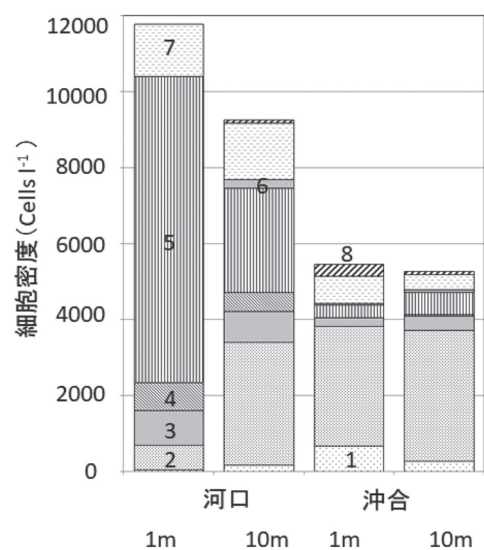


図 3. 河口と沖合 5000m 地点の表層と水深 5m 層の植物プランクトンの種組成。1: *Chaetoceros* spp. 2: *Skeletonema costatum*. 3: *Coscinodiscus* sp. 4: *Odontella* sp. 5: *Navicula* spp. 6: *Nitzschia* spp. 7: pinnate diatoms 8: centric diatoms の細胞密度 (細胞 ℓ^{-1}) を示す。

では *Skeletonema costatum* が優占し 1m 層と 10m 層でそれぞれ 57.5% と 67.4% を占めていた。中心目珪藻類の *Chaetoceros* spp.、*Coscinodiscus* sp.、*Odontella* sp. も高い頻度で認められ、沖合では中心目珪藻類が卓越する生物群集を形成していた。観察された羽状目珪藻は概して小型であったことが、2 倍近い細胞密度にもかかわらずほぼ同一のクロロフィル蛍光強度しか示さなかった原因と考えられる。

アンプリコン解析

種組成に明瞭な差異が認められた河口と沖合の藻類群集の全 DNA 試料を用いて *psbA* 領域を対象にアンプリコン解析を行った。その結果それぞれの試料について 6100-113000 の raw reads を得ることができた。解析プログラムを用いて結合すると、4 試料で合わせて 1000 以上の OUT が算出された。しかし、算出された OUT のほとんどが数回の出現頻度であり、PCR の際の複製ミスや計算上のノイズであると考えられた。出現頻度が 0.5% 以上の OTS は河口 1m 層と 10m 層、沖合 1m 層と 10m 層の試料でそれぞれ 19、23、21、21 配列に過ぎなかった。これらの OTS を BLAST 検索したところ、珪藻の *S. costatum* と一致するものがあり、プラシノ藻類の *Ostreococcus* sp.、緑藻類 *Bathycoccus prasinos*、*Pyramimonas* sp と高い相同性を示すものが認められた。これ以外の OUT の配列は未培養で未知の生物の配列との関係しか求めることができなかった。これらの結果は少なくとも *psbA* 領域はバーコード DNA としてこの海域の藻類群集に適用可能なほどの十分な情報の蓄積がないことを示していた。また、試料を顕微鏡観察して求めた種の中には、解析結果から示唆されたプラシノ藻類や緑藻類は認められなかった。それにも関わらず高い頻度で増幅されたアンプリコンがこれらの種と高い相同性を示したのは、用いた *psbA* 領域の配列が系統関係と対応しにくいこと示唆していた。実際にこれらの配列を用いて最尤法で系統樹を作成すると系統樹は大きく 3 群に枝分れた (図 4)。この結果は顕微鏡観察された珪藻類の中心目と羽状目の 2 群と *psbA* 領域の塩基配列から求めた系統が対応しないことを示していた。

検索された *S. costatum* について、群集内の細胞の相対密度 (%) と検出された配列の相対出現頻度 (%) を比較すると、細胞密度が 5.6 から 65.4% まで大きく変動するのに対して、配列の頻度は 17.3 から 8.9% しか変動せず、さらに、細胞密度が高い値を示す沖合 10m 層で最も低い配列の頻度を示していた。

結論

本実験の方法でフィルターろ過した海水試料から解析に必要な十分量のゲノム DNA が得られることが明らかになった。また、NextSeq 次世代シーケンサー 1 回の解析で、藻類群集の種組成・群集構造解析に必要な十分量のアンプリコンを得られることが明らかになった。本研究で用いた DNA 領域 (*psbA*) は、塩基配列が系統関係を反映しないこと、珪藻類に関するデータの蓄積が不十分であることが明らかになった。これらの結果は、解析する DNA 領域を適切なものに変えることで、本研究のプロトコルが藻類群集の解析に適用できる可能性を示唆していた。

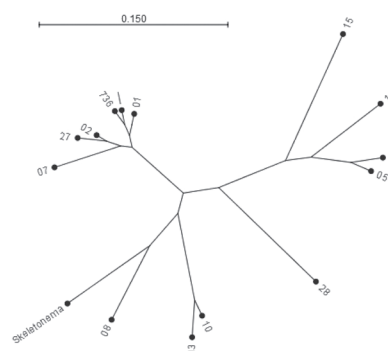


図 4. アンプリコン解析で求められた OUT 配列の系統関係。OUT 配列の DNA 塩基配列を用いて最尤法により求めた。図中横棒は遺伝距離を数字は OUT の番号を示す。BLAST 検索により種名が明らかになった *Skeletonema costatum* については図中でも属名を記す。

謝辞

相模湾プランクトン群集への NGS 活用の準備研究として実施した本研究は、神奈川大学理学部総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201710) により行われた。研究にご理解とご支援頂いた神奈川大学理学部総合研究所の所員の皆さんに深くお礼申し上げる

文献

- 1) 木元新作, 武田博清 (1989) 群集生態学入門. 共立出版, 東京.
- 2) 児玉 壮, 鈴木祥弘 (2010) 相模川河口域の海況と植物プランクトンの分布. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **21**: 65-69.
- 3) 平賀義路, 児玉 壮, 鈴木祥弘 (2012) 相模川河口域の植物プランクトンの分布への淡水流入の影響. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **23**: 59-66.
- 4) 平賀義路, 鈴木祥弘 (2013) 相模川河口域の植物プランクトンの分布の季節変化. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **24**: 55-62.
- 5) 山田 真 (2013) 珪藻 *Skeletonema* 属の最近の分類と生理生態特性 (総説). *日本プランクトン学会報* **60**: 18-28.
- 6) Lopez I and Erickson DL (2016) *DNA Barcodes: Methods and Protocols*. Humana Press, New York.